

称号及び氏名 博士（獣医学） 幸田 知子

学位授与の日付 平成23年2月20日

論文名 ボツリヌスB型神経毒素の受容体認識機構に関する研究

論文審査委員 主査 小崎 俊司  
副査 山崎 伸二  
副査 三宅 眞実

## 論文要旨

### 緒言

*Clostridium botulinum* の産生する神経毒素はヒトや動物に弛緩性麻痺を引き起こす極めて致死性の高い毒素である。神経毒素は抗原性の違いにより A から G 型に分類され、毒素型により罹患する動物種が異なる。A, B, E, F 型はヒトのボツリヌス中毒を引き起こし、C, D 型は家畜・家禽のボツリヌス症の原因と考えられている。神経毒素(BoNT: 150 kDa)は、型に共通した 3 つのドメイン、軽鎖(L: 50 kDa)、重鎖 N 末端領域( $H_N$ : 50 kDa)、重鎖 C 末端領域( $H_C$ : 50 kDa)から構成される。BoNT は 1 本鎖のポリペプチドで産生され、トリプシンなどの蛋白分解酵素により分子内に解裂が起こり、L 鎖と重鎖( $H_N+H_C$ )がジスルフィド結合した 2 本鎖となる。BoNT は標的細胞膜上に存在する受容体に  $H_C$  を介して結合し、エンドサイトーシスによりエンドソーム内に侵入後、 $H^+$ ポンプの働きにより酸性になったエンドソームの膜に  $H_N$  で孔を形成する。エンドペプチダーゼ活性をもつ L 鎖は細胞質内に移行し、神経伝達物質遊離に関与する SNARE(soluble NSF attachment protein receptor) 蛋白群を切断することにより、神経伝達物質の遊離を阻害し、弛緩性麻痺を引き起こすと考えられている。すべての型の毒素受容体の検索と機能解析が次々に行われ、B 型神経毒素(BoNT/B)は  $H_C$  を介してシナプトタグミン(Stg)I または StgII とガングリオシド GT1b または GD1a 複合体に結合することが明らかになっている。Stg は N 末端領域をシナプス小胞内腔に、1 カ所の膜貫通ドメインを介して C 末端領域を細胞質に突出した構造を持ち、エクソサイトーシスに伴って露出した N 末端領域に BoNT/B が結合する。BoNT/B に対して StgI は低親和性、StgII は高親和性の結合を示す。

BoNT/B と比較的相同性が高い BoNT/G も StgI および StgII を受容体として認識する。本研究では、BoNT/B の詳細な毒性発現機構を解明するために、BoNT/B 分子の H<sub>C</sub>ドメインに存在する受容体認識に必須のアミノ酸残基を特定した。さらに BoNT/B の毒性発現に関わる StgI、StgII および ganglioside が担う機能的役割について Stg 発現株化細胞を用いて、BoNT/B との結合および特異基質の切断を指標に解析を行うことにより、受容体の認識機構を明らかにすることを目的とした。

## 第1章 ボツリヌス B 型神経毒素のラット脳シナプトソームへの侵入

ラット脳シナプトソーム膜分画(P2)に <sup>3</sup>H-ノルアドレナリン(<sup>3</sup>H-NA)を取り込ませ、BoNT/B を 37°C で 90 分間反応後、高カリウム溶液による脱分極刺激により <sup>3</sup>H-NA の放出活性を測定した。BoNT/B 未処理の <sup>3</sup>H-NA 放出量を 100%としたとき、<sup>3</sup>H-NA 放出量は毒素濃度に依存して減少し、100 nM BoNT/B で約 70%となったが、細胞内基質蛋白である VAMP2(vesicle-associated membrane protein 2)の切断は、BoNT/B 処理、未処理に関わらず、差はみられなかった。しかし、P2 を低張処理後、遠心によって上清(LS1)を集めさらに超遠心によって得た粗シナプス小胞分画(LP2)の VAMP2 は BoNT/B 処理により約 60%に減少していたことから、BoNT/B による神経伝達物質の放出阻害は VAMP2 の切断と関連があることを確認した。さらに LP2 を連続スクロース密度勾配遠心し、各分画に含まれる BoNT/B の作用に関わる蛋白について Western blotting で調べた。シナプス小胞蛋白であるシナプトフィジンが豊富に存在するシナプス小胞分画は、BoNT/B 処理による VAMP2 切断の差が最も大きく、BoNT/B が局在していた。各分画における BoNT/B を非還元条件下で Western blotting で調べたところ、LS1 と同時に得られる粗シナプス細胞膜分画(LP1)には、未還元の BoNT/B と還元されて 2 本鎖となった H 鎖と L 鎖が存在したが、細胞質分画(LS2)には L 鎖のみが検出された。これらの結果から、受容体と結合し取り込まれた BoNT/B はシナプス小胞膜で還元を受け、解離した L 鎖が細胞質内に遊離することが示唆された。

## 第2章 ボツリヌス B 型神経毒素の受容体結合部位の同定

BoNT の受容体構成成分と考えられている ganglioside のアナログ、シアルラクトースと BoNT/B の共結晶構造解析から、ganglioside との結合に関与するアミノ酸残基が調べられているが、ganglioside GT1b と StgII の複合体を形成した受容体と BoNT/B 分子の結合様式は明らかではない。結晶構造解析の結果を基に、ganglioside と結合する H<sub>C</sub>(aa. 853-1291)の 1261 番目のトリプトファン(W1261)とその周辺の表面に存在するアミノ酸残基を主にアラニンに置換した点変異体を作製した。また、BoNT/B 標準株である Okra 株と比較して、乳児ボツリヌス症由来 111 株 BoNT/B は毒素活性が低く、受容体への親和性が異なることが明らかにされている。そこで、シアル酸と結合する E1188 周辺でループを形成し、111 株 BoNT/B の H<sub>C</sub> 領域で Okra 株 BoNT/B とは異なるアミノ酸残基を主にアラニンに置換した点変異体を作製した。点変異体の受容体への結合活性は <sup>125</sup>I-H<sub>C</sub> との 50%結合阻害濃度(IC<sub>50</sub>)を算出し、各アミノ酸残基の受容体結合への関与の程度を比較した。ganglioside GT1b との結合に関わるアミノ酸残基は、W1261 周辺とループ領域を含む広範囲に存在するが、StgII/ganglioside GT1b 複合体を認識するアミノ酸残基は、W1261 を中心とした限局した部位に存在していた。ラット小脳顆粒細胞を用いて、高カリウム溶液による脱分極刺激によるグルタミン酸の遊離を指標に H<sub>C</sub> 点変異体と BoNT/B の競合実験を行った。1 nM BoNT/B でグルタミン酸の遊離が約 75%阻害されたが、500 倍量の野生型 H<sub>C</sub> 存在下ではグルタミ

ン酸遊離の阻害の程度は約 20%であった。StgII/ガングリオシド GT1b 複合体を認識するアミノ酸残基の点変異体のうち、高い IC<sub>50</sub> 値を示した W1261A、Y1262A は、グルタミン酸の遊離阻害に影響を与えなかった。この結果から W1261 と Y1262 は、BoNT/B の受容体認識に深く関与していることが考えられた。Okra 株 H<sub>C</sub> の K1187 と E1190 は、それぞれアラニンに置換しても野生型 H<sub>C</sub> とほぼ同等の StgII/ガングリオシド GT1b 複合体との結合活性を保持していたが、111 株 H<sub>C</sub> と同位置のアミノ酸残基に置換した K1187E と E1190K は結合活性が低下し、BoNT/B のラット小脳顆粒細胞に対するグルタミン酸遊離阻害に影響を与えなかった。これらの結果は、両毒素間での受容体結合活性や毒素活性の違いには、これら 2 つのアミノ酸残基の置換が大きく関わっていることを示している。

### 第 3 章 シナプトタグミン II 発現 PC12 細胞を用いた BoNT/B の作用機構の解析

PC12 細胞は元来 StgI と StgIX、微量の StIV も発現している。BoNT/B は StgIX や StgIV には結合しない。PC12 細胞および StgI 欠損 PC12 細胞に StgII 遺伝子を導入し (StgII 発現 PC12 細胞)、BoNT/B の毒性発現における StgI と StgII およびガングリオシド GT1b の果たす機能的な役割を詳細に調べた。各細胞の StgI および StgII の発現は、蛍光免疫染色と可溶化した上清の Western blotting で確認した。PC12 細胞および StgII 発現 PC12 細胞に対する BoNT/B の作用は、高カリウム条件下で 15 分間処理した後、さらに 18 時間培養後の VAMP2 分解の程度を調べた。高濃度の BoNT/B で処理しても PC12 細胞の VAMP2 の切断は見られないが、ガングリオシド GT1b 添加と同時に BoNT/B を作用させると毒素濃度依存性に VAMP2 が切断された。StgII 発現 PC12 細胞に対する BoNT/B 処理では、毒素濃度に依存して VAMP2 は切断されるが、その程度はガングリオシド添加の方が高くなった。これらの結果は、StgI はガングリオシド共存下で、StgII は単独で BoNT/B 受容体として機能を発揮すると考えられた。StgII の N 末端領域から膜貫通領域までの欠失変異体を作製し、リポソームにガングリオシド GT1b と共に組み込み、<sup>125</sup>I-BoNT/B との直接的な結合活性を調べたところ、N 末端から 41-60 残基内のアミノ酸残基が BoNT/B の受容体の構築に関わっていることがわかった。StgII40-60 残基と BoNT/B の共結晶構造解析から、直接結合することが明らかになった StgII の 5 つのアミノ酸残基(F47、F54、F55、E57、K60)をアラニンに置換した点変異体 StgII 発現 PC12 細胞を作製した。点変異体 StgII の発現は蛍光免疫染色および Western blotting で確認した。点変異体 StgII 発現 PC12 細胞を BoNT/B 処理したところ、BoNT/B は、点変異体 E57A 発現 PC12 細胞に結合し、野生型と同程度の VAMP2 が切断されていた。これらの結果から BoNT/B の受容体とし、StgII 分子上で必須なアミノ酸残基は F47、F54、F55、K60 であると考えられた。

#### 総括

1. ラット脳シナプトソーム膜に結合した BoNT/B はシナプス小胞内に取り込まれ、神経伝達物質の放出阻害と VAMP2 を切断することにより毒性を発揮する。また BoNT/B はシナプス小胞のリサイクリング機構を利用して侵入後、L 鎖が細胞質へ遊離し、細胞内基質蛋白を切断することが示唆された。
2. BoNT/B はガングリオシド GT1b と H<sub>C</sub> 領域の W1261 周辺の広範囲のアミノ酸残基を介して結合する。一方、StgII/ガングリオシド GT1b 複合体とはさらに限局した部位で結合していることが明らかになった。Okra 株と 111 株の受容体結合活性および毒素活性の違いは H<sub>C</sub> 領域の

K1187 と E 1190 のアミノ酸置換であると考えられた。

3. PC12 細胞と StgII 発現 PC12 細胞を用いて、StgI はガングリオシド GT1b 共存下で、StgII は単独で BoNT/B の受容体として機能すると考えられた。また BoNT/B の受容体として機能的な役割を果たす Stg II のアミノ酸残基は F47、F54、F55、K60 であることを明らかにした。

## 審査結果の要旨

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) の産生する神経毒素はヒトや動物に弛緩性麻痺を引き起こす極めて致死性の高い毒素である。A, B, E, F 型はヒトのボツリヌス中毒を引き起こし、C, D 型は家畜・家禽のボツリヌス症の原因と考えられている。神経毒素 (BoNT : 150 kDa) は、型に共通した 3 つのドメイン、軽鎖 (L : 50 kDa)、重鎖 N 末端領域 ( $H_N$  : 50 kDa)、重鎖 C 末端領域 ( $H_C$  : 50 kDa) から構成される。BoNT は標的細胞膜上に存在する受容体に  $H_C$  を介して結合した後、細胞内に取り込まれ、L 鎖が神経伝達物質遊離に関与する蛋白群を切断し弛緩性麻痺を引き起こす。B 型神経毒素 (BoNT/B) は  $H_C$  を介してシナプトタグミン (Stg) I または StgII とガングリオシド GT1b または GD1a 複合体に結合することが明らかになっている。Stg は N 末端領域をシナプス小胞内腔に、1 カ所の膜貫通ドメインを介して C 末端領域を細胞質に突出した構造を持ち、エクソサイトシスに伴って露出した N 末端領域に BoNT/B が結合する。StgI は低親和性、StgII は高親和性の結合を示す。本研究では、BoNT/B の詳細な毒性発現機構を解明するために、BoNT/B 分子の  $H_C$  ドメインに存在する受容体認識に必須のアミノ酸残基を特定した。さらに BoNT/B の毒性発現に関わる StgI、StgII およびガングリオシドが担う機能的役割について Stg 発現株化細胞を用いて、BoNT/B との結合および基質の切断を指標に解析を行うことにより、受容体の認識機構を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、脳シナプトソーム膜分画 (P2) からの  $^3H$ -ノルアドレナリン ( $^3H$ -NA) 放出を指標に BoNT/B の毒素活性を測定した。 $^3H$ -NA 放出量は毒素濃度に依存して減少したが、基質蛋白である VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2) の切断に差はみられなかった。しかし、粗シナプス小胞分画 (LP2) では VAMP2 の切断と関連性が認められた。シナプス細胞膜分画 (LP1) には還元された H 鎖と L 鎖が認められ、細胞質分画 (LS2) に L 鎖が検出された。

第 2 章では Okra 株 BoNT/B の受容体結合部位を明らかにするために、結晶構造解析の結果を参考に  $H_C$  (aa. 853-1291) 領域の 1261 番目のトリプトファン (W1261) 周辺のアミノ酸残基、毒性が低い 111 株 BoNT/B の  $H_C$  領域で Okra 株 BoNT/B とは異なるアミノ酸残基などの単アミノ酸置換体を作製した。これら置換体の受容体への結合活性は  $^{125}I$ - $H_C$  との 50% 結合阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) を算出し、各アミノ酸残基の受容体結合への関与の程度を比較した。ガングリオシド GT1b との結合に関わるアミノ酸残基は、W1261 周辺とループ領域を含む広範囲に存在するが、StgII/ガングリオシド GT1b 複合体を認識するアミノ酸残基は、W1261 を中心とし

た限局した部位に存在していた。ラット小脳顆粒細胞を用いて単アミノ酸置換体 H<sub>c</sub> と BoNT/B の競合実験を行った結果、W1261 と Y1262 が受容体認識に深く関与していると考えられた。Okra 株 H<sub>c</sub> の K1187 と E1190 を 111 株 H<sub>c</sub> と同位置のアミノ酸残基に置換した K1187E と E1190K は結合活性が低下したことから、両毒素間の毒性の違いはこれらのアミノ酸残基の関与が示唆された。

第3章では、PC12 細胞と StgI 欠損 PC12 細胞に StgII 遺伝子を導入した細胞 (StgII 発現 PC12 細胞) に対する BoNT/B の影響を調べ、StgI はガングリオシド共存下で、StgII は単独で BoNT/B 受容体として機能を発揮すると考えられた。StgII の5つのアミノ酸残基 (F47、F54、F55、E57、K60) のアラニン置換体 StgII 発現 PC12 細胞を作製し、BoNT/B の作用を調べた。その結果、BoNT/B 受容体として必須なアミノ酸残基は F47、F54、F55、K60 であり、StgI 分子には存在しない F55 が StgII の受容体蛋白としての特性を決定していることが推測された。

以上の結果は、ボツリヌス神経毒素と受容体の相互認識機構をアミノ酸レベルまで明らかにすることで、中毒の発症機構の解明に大きく貢献すると考えられる。さらに、現在、利用が拡大している治療薬としてのボツリヌス毒素の適用においても新たな視点を加えることができると考えられ、これら一連の成果は、感染制御学および神経科学領域で新たな知見を提供するものであり、学力確認試験の結果と併せて博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。